

# **A pikkelysömörös nem-léziós bőr elváltozásai**

Ph.D. értekezés tézisei

**Konczné Gubán Barbara**



Bőrgyógyászati és Allergológiai Klinika  
Szegedi Tudományegyetem

Szeged

2016

# **A pikkelysömörös nem-léziós bőr elváltozásai**

Ph.D. értekezés tézisei

**Konczné Gubán Barbara**

Témavezető:

Prof. Dr. Bata-Csörgő Zsuzsanna

Bőrgyógyászati és Allergológiai Klinika

Szegedi Tudományegyetem

Szeged

2016

## **1. BEVEZETÉS**

### **1.1. A pikkelysömör egy komplex, gyulladásos bőrbetegség**

A pikkelysömör egy multifaktoriális bőrbetegség, amely a lakosság 2-3%-át érinti világszerte, azonban főként az európai, amerikai és kanadai populációkban fordul elő. A leggyakoribb típusa a Psoriasis vulgaris, amely plakkos formában jelenik meg. A pikkelysömörös bőr megváltozott celluláris összetételére jellemző a keratinocita hiperproliferáció és a fokozott T sejt infiltráció, amely az aktivált immunsejtek, dendritikus sejtek, makrofágok és veleszületett immunsejtek által termelt citokinek hatására alakul ki. Genetikai kockázati faktorok és a környezeti tényezők egyaránt hozzájárulnak a pikkelysömör patomechanizmusához.

A tanulmányok elsősorban a léziós bőr rendellenességeinek megismerésére fókuszáltak, ennek eredményeként a pikkelysömör ma már egy jól karakterizált krónikus bőrbetegség, ahol a veleszületett és az adaptív immunrendszer aktiválása egyaránt szerepet játszik a bőr rendellenes fenotípusának manifestációjában és fenntartásában. Azonban sokkal kevesebb ismeret áll rendelkezésünkre a szövet rezidens sejtjeinek szerepéről a betegség patológiájában. Kutatásaink a pikkelysömör szöveti elváltozásainak vizsgálatára irányultak, a fenotipikusan egészségesnek kinéző nem-léziós (NL) bőrre fókuszálva.

### **1.2. A fibronectin-kötő integrinek szerepe**

Az integrinek sejtfelszíni transzmembrán receptorok, amelyek egy  $\alpha$  és egy  $\beta$  alegységből állnak. Fontos szerepet játszanak az extracelluláris mátrix (ECM) különböző komponenseinek összekapcsolásában az intracelluláris citoskeletonnal. A fibronectin (FN) egy szekretálódó fehérje, amely szolubilis dimerként szekretálódik, majd integrinekhez kapcsolódva oligomerizálódik és fibrilláris szerkezetet alakít ki. A fő FN receptor az  $\alpha 5 \beta 1$  integrin, amely fokozottan fejeződik ki a NL bőrben az egészségeshez viszonyítva. NL bőrben az  $\alpha 5 \beta 1$  integrin nagy mértékű kifejeződésének egyik lehetséges magyarázata lehet, a FN extra domén A-t ( $\text{EDA}^+\text{FN}$ ) tartalmazó izoformájának fokozott jelenléte a bazális keratinociták mikrokörnyezetében.

### **1.3. Az EDA<sup>+</sup>FN és a FN szerkezete és funkciója**

A FN az ECM egyik multifunkcionális komponense, amely mátrixot alakít ki a sejtek számára, emellett szabályozza a biokémiai és mechanikai jelek áramlását, amellyel hozzájárul a celluláris viselkedés kialakulásához. A FN-nek két fő formája ismert: a plazma és a celluláris FN. A FN tartalmazhat egy vagy kettő III-as típusú domént, amit Extra Domén A-nak és B-nek neveznek (EDA és EDB). Ez a két domén alternatív splicinggal képes bent maradni vagy kivágódni. A celluláris FN forma tartalmazhatja az EDA domént, amely az ECM-ben megtalálható alkotóként. Az EDA és az EDB splicing formák megjelenése az embrionális fejlődés során a legkifejezettebb. Posztnatális időszakra a mennyiségük lecsökken és a kor előrehaladtával további csökkenést mutatnak. Azonban az EDA<sup>+</sup>FN mennyisége megemelkedik az erősen proliferálódó felnőtt szövetekben, szöveti regeneráció, sebgyógyulás és angiogenezis során és befolyásolja a sejtek adhézióját, differenciációját és a sejtciklus progresszióját.

### **1.4. A KGF és az FGFR2 struktúrája és funkciója**

A fibroblaszt növekedési faktorok (fibroblast growth factors, FGFs) kis méretű polipeptidek, amelyek növekedési faktorként vesznek részt a celluláris folyamatokban. Az FGF család 23 tagból áll és közös szerkezeti jellemzőkkel rendelkeznek. A fibroblaszt növekedési faktor 7 (FGF7) vagy más néven keratinocita növekedési faktor (KGF), a mezenchymális eredetű sejtek által termelődik és a keratinocitáknak fő növekedési faktora. A bőrben a KGF-et a dermális fibroblasztok termelik, melynek termelődését a keratinociták interleukin 1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) expresszióján keresztül képesek befolyásolni. Ismert, hogy a KGF keratinocita proliferációt és differenciációt indukál. Mitogén aktivitás vizsgálattal meghatározták, hogy a KGF az epithél sejtekre a fibroblaszt növekedési faktor receptor 2-IIIb (FGFR2-IIIb) splice variánsan keresztül fejti ki legerősebben hatását. A KGF képes a sejtproliferációt befolyásolni az FGFR2-IIIc-n és az FGFR1-en keresztül is, azonban sokkal kisebb hatékonysággal.

Az FGFR család tagjai: az FGFR1, az FGFR2, az FGFR3 és az FGFR4, melyeket különböző FGF-ek képesek aktiválni. Az FGFR-ek transzmembrán receptorok, amelyeknek fő részei: az extracelluláris ligand-kötő domén, egy transzmembrán domén és egy citoplazmikus domén. Az FGFR2-nek két izoformája ismert az FGFR2-IIIb és az FGFR2-IIIc.

## **1.5. Az FGF és az FGFR jelátviteli útvonala**

Az FGF-ek specifikus FGFR-ekkel kötődnek, így valósul meg a jelátvitel. Az FGF-ek szekretált glikoproteinek, amelyek az ECM-ben lokalizálódnak vagy pedig a sejtfelszínhez kötődnek heparin-szulfát proteoglikánokkal (HPSGs). Az aktivált FGFR2 foszforilálja az FGFR szubsztrát 2-t (FRS2), amely kapcsolódik a növekedési faktor receptor kötő fehérje 2-vel (growth factor receptor-bound protein 2, GRB2), ezáltal aktiválódik a RAS-RAF-MEK-MAPK/ERK útvonal. Különálló komplexet alkotva a GRB2-kötő fehérje 1– foszfinozitol-3-kináz (GAB1-PI3K) aktiválja az AKT függő anti-apoptotikus jelátviteli kaszkádot. Emellett az Src homológ 2 (SH2) domén kötést alakít ki a foszfolipáz-C $\gamma$ -val (PLC $\gamma$ ), így aktiválódik a protein kináz C (PKC), amely fokozott MAPK aktivációhoz vezet.

## **1.6. A KGF és az FGFR2 szerepe a betegségek patofiziológiában és terápiájában**

Számos tanulmány kiemeli, hogy a KGF fontos funkciót tölt be a sebgyógyulás és a szöveti regenerálódás során. Az FGF parakrin jelátviteli folyamatait fontos terápiás célpontként írták le mucositisben és sebgyógyulásban. Az FGFR2 genetikai elváltozásai az FGFR2 jelátvitel diszregulációját okozzák, amely vezethet veleszületett rendellenességekhez és szerzett betegségekhez, mint a melanóma, az Apert szindróma és az atópiás dermatitisz. Apert szindrómában, az FGFR2 mutációját írták le, ahol a ligand specificitási vizsgálatok azt mutatták, hogy a mezenhimálisan expresszálódó FGF7 képes kötődni, ezáltal aktiválni az FGFR2-IIIc splicing formát is.

## **1.7. A JAK-STAT jelátviteli folyamatok szerepe a humán betegségekben**

A Janus kináz (Janus kinase, JAK)- szignál transzducer és transzkripció aktivátor (STAT) útvonal egyaránt fontos szerepet játszik a veleszületett és a szerzett immunitásban, hozzájárulva néhány gyulladásos folyamat manifesztációjához. Emlősökben a JAK család 4 tirozin kinázból áll, míg a STAT családnak 7 tagja van. A JAK-STAT útvonalat körülbelül 50 citokin és egyéb növekedési faktorok képesek aktiválni, ezek között megtalálhatóak interferonok, kolónia stimuláló faktorok, számos interleukin és hormonok. A dimerizált JAK-ok autofoszforilálódnak, így lehetővé válik a STAT-ok kötése és foszforilációja. A foszforilált STAT monomerek dimereket alkotnak, transzlokálódnak a sejtmagba, ahol befolyásolják számos gén transzkripcióját. Számos tanulmány beszámol a JAK-STAT útvonal eltéréseiről krónikus bőrbetegségekben: pikkelysömörben, atópiás dermatitiszben és melanómában.

STAT1 lokalizációt a normál bőrben elsősorban a szarurétegben figyelték meg. Melanóma III. és IV. stádiumában STAT1 és STAT5 foszforilációs hibát írtak le, amely az IL-2 hibás válaszát okozza. A STAT1-nek szupresszor funkciója van tumorokban, amelyet valószínűleg a  $\text{TNF}\alpha$  által kiváltott apoptotikus program mediál. Azon betegek, akiknek funkcióvesztéses STAT1 mutációjuk van, hajlamosak a mikobakteriális és vírusos infekciókra, míg akiknek funkciónyeréses mutációjuk van fogékonyabbak a gombás fertőzésekre.

## 2. Célkitűzések

A pikkelysömör patogenezise még nem teljesen ismert, azonban számos tanulmány javasol hipotéziseket az immundiszregulációkra, a bőr mikrobióta rendszerre vagy az extracelluláris mátrix elváltozásaira vonatkozóan, amelyek lényeges szerepet játszhatnak a betegség kialakulásában. A folyamatosan növekvő irodalom arra enged következtetni, hogy az egészségesnek kinéző NL pikkelysömörös bőr egy kiegyensúlyozatlan fenotípust mutat, amely szerkezeti változásokat hordoz magában az egészséges bőrhöz képest, így érzékenyebb a betegség kialakulására. A bazálmembrán elváltozásai a dermális- epidermális határnál (DEJ), a NL bőrben aktivált, krónikus sebgyógyulós fenotípust mutatnak.

Normál keratinocitákkal ellentétben, a FN képes fokozni a sejtciklust NL bőrben T-sejt limfokinek hiányában is. A FN fő receptora az  $\alpha 5 \beta 1$  integrin fokozottan fejeződik ki NL pikkelysömörös epidermiszben, az egészséges epidermiszhez képest. Számos tanulmány szerint a KGF, a FN és az  $\alpha 5 \beta 1$  integrin fontos szerepet játszhat a pikkelysömör patogenezisében, azáltal hogy befolyásolják a gyulladást és a keratinocita hiperproliferációt. Kutatómunkánkban a NL bőrben lévő elváltozásokra, valamint az  $\text{EDA}^+\text{FN}$  és a KGF szerepére fókuszáltunk a pikkelysömör kialakulásának és progressziójának jobb megértése érdekében.

### Ezért célul tűztük ki:

- A KGF, az FGFR2, az  $\text{EDA}^+\text{FN}$  és az  $\alpha 5$  integrin kifejeződésének vizsgálatát egészséges és NL pikkelysömörös bőrben.
- A KGF hatásának tanulmányozását az  $\text{EDA}^+\text{FN}$  és a FN termelésre fibroblasztokban, keratinocitákban és HaCaT sejtekben.
- Az FGFR2 különböző splice-variánsainak vizsgálatát fibroblasztokban, keratinocitákban és melanocitákban.
- Azon jelátviteli útvonalak azonosítását, amelyeken keresztül a KGF képes befolyásolni és módosítani az  $\text{EDA}^+\text{FN}$  és a FN kifejeződését egészséges és NL bőrből származó fibroblasztokban.
- A feltételezett korreláció tanulmányozását a STAT1 aktiváció, az egészséges, NL és léziós bőr valamint a betegek PASI értékei között.
- Egy *in silico* modell létrehozását, alapul véve a transzkripciós szabályozó molekulákat és egyesíteni az *in vitro* eredményeinkkel, valamint hozzákapcsolni a KGF és a FN jelátvitelt.

### **3. Anyagok és módszerek**

#### **3.1. Bőr biopsziák**

A mintákat 16 betegtől és 25 egészséges önkéntestől gyűjtöttük a kísérlethez. Úgynevezett „tape-stripping” módszerrel mechanikai stresszt indukáltunk, majd 24 és 48 óra elteltével punch-biopsziákat vettünk az egészséges személyektől és a pikkelysömörös betegek NL bőr területeiről is. Az összes többi kísérlethez mechanikai stressz nélküli mintát használtunk fel.

#### **3.2. Sejtkultúrák**

Primer keratinocitákat, melanocitákat és fibroblasztokat enzimátikus módszerrel izoláltunk standard protokoll alapján egészséges egyének vagy pikkelysömörös betegek bőr biopsziáiból. A fibroblasztokat, keratinocitákat, melanocitákat és HaCaT sejteket 37°C-on, 5% CO<sub>2</sub> tartalom mellett standard körülmények között tenyésztettünk.

Fibroblasztokat, keratinocitákat és HaCaT sejteket 6 lyukú edényekben tenyésztettünk, a kezdeti denzitás 200.000 sejt/lyuk volt, ezt követően 25 ng/mL koncentrációjú KGF-el 24 óráig inkubáltuk; kezeletlen sejteket kontrollként alkalmaztunk. A KGF jelátviteli útvonalakat blokkoló kísérletekhez a következő gátlószereket használtuk: MEK1, AKT ½ kináz, STAT1 és STAT3 gátlószerek.

#### **3.3. RNS extrakció és valós idejű kvantitatív reverz transzkripció polimeráz lánc reakció (RT qRT-PCR)**

A 6 lyukú edényben lévő sejteket egyszeres PBS-es (phosphate buffered saline) mosást követően 0.5 ml TRIzol<sup>TM</sup> reagensben vettük fel. Total RNS-t a gyártó további instrukciói szerint izoláltunk. Minden RNS-t DNA-free<sup>TM</sup> reagenssel kezeltünk. cDNS-t 1 µg RNS-ből szintetizáltunk iScript cDNS Synthesis Kit segítségével a gyártó protokollja alapján. Mindegyik gén termék gyakoriságát 18S rRNS gén expressziójához normalizáltuk. A relatív mRNS szinteket 2<sup>-ΔΔCt</sup> módszerrel határoztuk meg.



### 3.4. Immunfluoreszcens festés

A humán punch biopsziákat fagyasztásos módszerrel beágyasztuk, -80 °C-on tároltuk, ezt követően 6 µm-es metszeteket készítettünk belőlük. Az alkalmazott elsődleges antitestek: FGFR2, KGF,  $\alpha_5$  integrin, EDA<sup>+</sup>FN, pSTAT1(Ser727) és pSTAT1 (Tyr701). Felhasznált másodlagos ellenanyagok: kecske anti-nyúl IgG-Alexa Fluor 488, számár anti-kecske IgG-Alexa Fluor 546, kecske anti-egér IgG-Alexa Fluor 647 és Alexa Fluor 546. Negatív festési kontrollként elsődleges antitest nélküli vagy izotípus kontroll antitesttel inkubált mintákat alkalmaztunk. A sejtmagokat DAPI-val festettük meg.

### 3.5. Áramlási citometria

A sejteket a fent leírtak szerint tenyésztettük, majd Fixáló/Permeabilizáló oldattal kezeltük, ezt követően PBS-sel mostuk. Elsődleges ellenanyagként anti-EDA<sup>+</sup>FN-t és anti-FN-t alkalmaztunk 45 percig. Egér IgG1 ellenanyagot használtunk izotípus kontrollként. A sejteket PBS-sel mostuk, és másodlagos ellenanyagokkal inkubáltuk. A mintákat FACS Calibur áramlási citométerrel analizáltuk 488 és 633 nm hullámhosszú lézerekkel.

### 3.6. Bioinformatikai analízis és modell konstrukció

STRING, KEGG és Reactome adatbázisokat használtunk forrásként a fehérje-fehérje interakciók és a jelátviteli útvonalak létrehozásához; SABiosciences' transzkripciós faktorok kötődési adatait és CisRED (p<0.001) alkalmazást használtunk a fehérje-DNS interakciók modellezéséhez. A transzkripciós szabályozás irányát korrelációs mátrixal határoztuk meg. Gabig-Cimińska és munkatársai 48 dermális fibroblaszt mintán végeztek microarray kísérleteket, analízisünkhöz ezen Gén Expressziós Omnibuszba feltöltött eredményeket használtuk. A próbát a legnagyobb interquartális tartománnyal (IQR) választottuk ki összetett próbák segítségével. A koexpressziós mátrix létrehozásához a MATLAB R2014b-t alkalmaztuk. A KGF, FN jelátvitelhez, és a FN splicinghoz kapcsolódó géneket és fehérjéket, valamint ezen gének szabályozási mechanizmusait gyűjtöttük össze és használtuk fel a mátrix létrehozásához.

## 4. Eredmények

### 4.1. Megváltozott $\alpha 5$ integrin, EDA<sup>+</sup>FN, KGF és FGFR2 fehérje termelődés pikkelysömörös NL bőrben

Egészséges és pikkelysömörös NL bőrben megvizsgáltuk az  $\alpha 5$  integrin, az EDA<sup>+</sup>FN, a KGF és az FGFR2 fehérjék kifejeződését kezelés nélkül és 24, 48 órával tape strippinget követően. Kezelés nélkül, pikkelysömörös NL bőrben mind a 4 fehérje intenzívebb immunfluoreszcens festődést mutatott az egészséges mintákhoz képest. NL bőrben a tape strippinggel indukált enyhe mechanikai stressz nem vezetett változáshoz az  $\alpha 5$  integrin, az EDA<sup>+</sup>FN, a KGF és az FGFR2 fehérjék mennyiségében és szöveti eloszlásában 24 és 48 órával a kezelés után. Azonban az immunfluoreszcens festés alapján megfigyelhető volt, hogy a fent említett fehérjék kifejeződése enyhe emelkedést mutatott tape strippinggel kezelt egészséges kontroll mintákon a kezeletlen egészséges mintákhoz viszonyítva.

### 4.2. Egészséges humán fibroblasztokban KGF kezelés hatására növekedett az EDA<sup>+</sup>FN fehérje termelődése

Az EDA<sup>+</sup>FN és a KGF fehérje szintje egyaránt eltérést mutatott pikkelysömörös NL bőrben az egészségeshez viszonyítva, ezért megvizsgáltuk, hogy van-e szabályozási kapcsolat a két molekula között. Alapul véve az immunfluoreszcens és az áramlási citometriás mérési eredményeket, 24 órás exogén KGF kezelés hatására növekedett az EDA<sup>+</sup>FN splice variáns mennyisége, azonban az össz-FN szintje nem változott egészséges tenyésztett fibroblasztokban. Az EDA<sup>+</sup>FN expressziója mRNS szinten is növekedést mutatott, míg az össz-FN mRNS mennyisége változatlan maradt. A KGF hatását megvizsgáltuk normál humán keratinocitákon és HaCaT sejteken is. A keratinociták és a HaCaT sejtek nagyon alacsony szinten expresszálták a FN-t és az EDA<sup>+</sup>FN-t a fibroblasztokhoz képest. Ezekben a sejtekben *in vitro* KGF kezelés hatására nem változott az EDA<sup>+</sup>FN és az össz-FN mRNS és fehérje expressziója.

### 4.3. Az FGFR2 splice variánsok expressziója fibroblasztokban, melanocitákban és keratinocitákban

Az FGFR2-nek két splice variánsát azonosították, az FGFR2-IIIb-t és az FGFR2-IIIc t, amelyek eltérő ligand-kötő specificitással rendelkeznek. Ezek az eredmények mitotikus aktivitási méréseken alapulnak. A KGF az FGFR2-IIIb variánson keresztül képes növelni a

celluláris proliferációt. RT-PCR-ra tervezett specifikus primerek segítségével, meghatároztuk a splice variánsok expresszióját egészséges fibroblasztokban, melanocitákban és keratinocitákban. Kimutattuk, hogy a melanociták és a keratinociták csak az FGFR2-IIIb, míg a fibroblasztok főként az FGFR2-IIIc variánst expresszálják.

#### **4.4. A KGF a MAPK jelátviteli útvonalon keresztül képes befolyásolni az EDA<sup>+</sup>FN regulációját egészséges fibroblasztokban**

Az FGF jelátvitel 4 fő útvonalon keresztül szabályozódhat: a RAS-RAF-MAPK, a PI3-AKT, a STAT és a PLC $\gamma$  jelátviteli útvonalakon. A KGF által regulált FN expresszió jobb megértése céljából a fő szignáltranszdukciós útvonalak kulcsfontosságú molekuláit blokkoltuk egészséges bőrből származó fibroblasztokban, specifikus gátlószereket alkalmazva, önmagában vagy kombinációban: MEK1 (MAPK), AKT1/2 (PI3-AKT), STAT1 és STAT3 (STAT). 24 órás gátló kezelést követően meghatároztuk a FN és az EDA<sup>+</sup>FN expresszióját áramlási citométerrel és RT-PCR-al. A KGF indukálta EDA<sup>+</sup>FN emelkedés MEK1 inhibítorral gátolható volt, melynek eredményeként a mennyisége a kontroll fibroblasztok szintjére csökkent. Ezzel ellentétben az AKT1/2 gátlószernak nem volt hatása az EDA<sup>+</sup>FN fehérje mennyiségére. A STAT1 vagy STAT3 gátlás nem befolyásolta a KGF-mediálta EDA<sup>+</sup>FN fehérje termelődését, azonban, ezek a jelátviteli útvonalakat gátló molekulák a KGF-től függetlenül növelték a FN és az EDA<sup>+</sup>FN fehérjék szintjét, amely a STAT1 gátlás esetében szignifikáns változást okozott.

#### **4.5. A pikkelysömörös bőrben megfigyelt abnormális STAT1 aktiváció fontos szerepet játszhat a FN és az EDA<sup>+</sup>FN regulációjában**

További vizsgálataink során, összehasonlítottuk a FN és az EDA<sup>+</sup>FN expresszióját egészséges és pikkelysömörös NL bőrből származó fibroblaszt kultúrákban 24 órás STAT1 vagy STAT3 gátlást követően. Ellentétben az egészséges kontrollal, a STAT1 gátlás nem vezetett az össz-FN és az EDA<sup>+</sup>FN splice variáns emelkedéséhez NL bőrből származó fibroblasztokban. A STAT3 gátlás nem okozott szignifikáns változást.

Ezért következő lépésként, megvizsgáltuk a STAT1 Tyr701 és Ser727 foszforilációs alakjainak mintázatát, melyekről ismert, hogy befolyásolják a molekula dimerizációját, illetve aktivitását. Immunfluoreszcens festéssel vizsgált foszforilált Ser727 forma intenzitása magasabb volt léziós bőrben, alacsonyabb, de jól detektálható volt egészséges bőrben, míg a legalacsonyabb intenzitást a NL bőrből származó minták mutatták. A foszforilált Tyr701

festés sokkal kisebb mértékben volt megfigyelhető, de hasonló mintázatot mutatott. Azokban a betegekben, ahol a szerin foszforiláció nem volt detektálható, ott a foszforilált Tyr701 szintén nem volt megfigyelhető, sem a NL, sem a léziós területeken. Annak tisztázására, hogy a vizsgálat során különböző STAT1 aktivitást mutató betegek és a betegség súlyossága között van-e korreláció, összehasonlítottuk a betegek PASI értékeit. Azok a betegek, akiknek a NL bőre negatív foszforilációt mutatott, alacsonyabb PASI értékekkel (12,4 és 17,8) rendelkeztek, míg magasabb PASI értéknél (19,6 és 20) már megfigyelhető volt egy alacsony STAT1 aktivitás NL bőrben.

A STAT1 aktivitás erős korrelációt mutatott a PASI értékekkel. Magas PASI értékek (pl.: 19,6) esetén intenzív pSTAT1 (Ser727) festődés volt megfigyelhető léziós bőrben, és ezeknél a betegeknel, a NL bőrben is kismértékű STAT1 aktivitás volt kimutatható. Ezzel ellentétben, az alacsony PASI értékekkel rendelkező betegek (pl.: 9,8) NL bőrében egyáltalán nem volt detektálható STAT1 aktivitás. A NL bőr pSTAT1 (Ser727) aktivációja és a betegek PASI értékei párhuzamos csökkenést mutattak. Az aktivált STAT1 Tyr (701) forma gyorsan inaktiválódik, ezért csak magas PASI értékű betegek esetén volt detektálható, ahol mindkét foszforilációs forma jelenléte sokkal intenzívebb volt. Összehasonlítottuk a léziós bőrtől közel és távol vett NL bőr mintákon a két különböző pSTAT1 forma aktivációjának mértékét, annak érdekében, hogy megvizsgáljuk, vajon a léziós terület hatással van-e a körülötte lévő NL bőrre. Vizsgálataink szerint, a STAT1 aktivitás független a lézióktól való távolságtól, amelynek határát egy éles vonal jelzi a NL és a L bőr között.

#### **4.6. *In silico* modell konstrukció**

*In silico* modellt készítettünk, amelynek alapjául szolgáltak *in vitro* eredményeink beleértve a KGF- és a FN-jelátvitelt, mindemellett tartalmazta a transzkripcionális szabályozó hálózatot is. Adataink rámutattak arra, hogy a MAPK jelátvitel részt vesz a KGF indukálta FN splicing szabályozásában. Az általunk generált koexpressziós mátrix alapján úgy gondoljuk, hogy potenciális szerepe lehet a peptidil-prolil cisz–transz izomeráznak (PPIG), amely fehérje egyaránt fontos a fehérje foldingban és splicingban, valamint regulálódik a MEK1 indukálta AP-1 által. A MEK1 aktivitásának megváltozása a PPIG-n keresztül módosította a FN splicingot, ezáltal növekedett az EDA<sup>+</sup>FN szintje. Modellünk azt mutatja, hogy a STAT3 negatívan regulálja a MEK1 expresszióját, ez arra utal, hogy ez a folyamat felelős lehet a STAT1 gátlás hatására megnövekedett EDA<sup>+</sup>FN termelésért.

## 5. Összefoglalás

A pikkelysömörös NL bőr már elváltozásokat tartalmaz, amely mikrokörnyezet valószínűleg elősegíti a betegség manifesztációját. A FN és splice variánsa az EDA<sup>+</sup>FN alapvető extracelluláris mátrix fehérjék, amelyek befolyásolják a fő celluláris folyamatokat és kóros kifejeződésük figyelhető meg pikkelysömörös bőrben. A KGF fehérje emelkedett jelenlétét írták le pikkelysömörös léziós bőrben, amely fokozott keratinocita proliferációt indukál. A fent említett folyamatok fontos szerepet játszanak a pikkelysömör patomechanizmusában, ezért ebben a tanulmányban vizsgálataink a KGF, az FGFR2, a FN és az EDA<sup>+</sup>FN fehérjék vizsgálatára irányultak egészséges és NL pikkelysömörös bőrben, valamint tanulmányoztuk a KGF, a FN és az EDA<sup>+</sup>FN között fennálló lehetséges szabályozási mechanizmusokat fibroblasztokban.

Megfigyeléseink azt mutatják, hogy pikkelysömörös NL bőrben a KGF, az FGFR2, az  $\alpha_5$  integrin és az EDA<sup>+</sup>FN fokozottan termelődik az egészséges bőrhöz képest. A KGF kis mértékben indukálja az EDA<sup>+</sup>FN kifejeződését egészséges fibroblasztokban, azonban az össz-FN termelődést nem befolyásolja. Eredményink azt mutatják, hogy a KGF által szabályozott EDA<sup>+</sup>FN termelés autokrin módon valósul meg a MAPK jelátviteli útvonalon keresztül.

Alapul véve ezeket az eredményeket, létrehoztunk egy *in silico* modellt, amely megmutatja a lehetséges kulcsmolekulákat, amelyek egy szabályozási hálózatot alkotva, alátámasztják a KGF által az EDA<sup>+</sup>FN termelésre kifejtett hatását. *In vitro* eredményeink azt mutatják, hogy a STAT1 egyaránt negatívan regulálja a FN és az EDA<sup>+</sup>FN kifejeződését egészséges fibroblasztokban, azonban ez a szabályozási mechanizmus sérül a NL pikkelysömörös dermiszből származó fibroblasztokban. STAT1 aktivációt detektáltunk egészséges és léziós bőrben, azonban NL bőrben a STAT1 aktiváció szinte teljesen hiányzik, függetlenül a lézióktól való távolságtól.

Ezen eredmények arra engednek következtetni, hogy a fibroblasztok által termelt FN és EDA<sup>+</sup>FN, valamint a STAT1 jelátvitel kórosan szabályozódik pikkelysömörös NL bőrben, amely hozzájárulhat a krónikus gyulladásos fenotípust megelőző preaktivált stádium kialakulásához és fenntartásához pikkelysömörös nem léziós bőrben.

## KÖZLEMÉNYEK

### A dolgozat témakörébe tartozó közlemények

- I. Guban B, Vas K, Balog Z, Manczinger M, Bebes A, Groma G, Szell M, Kemeny L, Bata- Csorgo Zs  
**Abnormal regulation of fibronectin production by fibroblasts in psoriasis.** Br J Dermatol. 2016 Mar; 174(3):533-541. doi: 10.1111/bjd.14219. Epub 2016 Jan 3.  
**IF: 4.275**
- II. Gubán B, Kui R, Képiró L, Bebes A, Groma G, Kemény L, Bata-Csörgő Zs  
**Abnormal STAT1 activation in psoriasis**  
Hungarian Journal of Dermatology and Venerology Review, 2016 February, 92:18-21. doi: 10.7188/bvsz.2016.92.1.3.

## KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Szeretnék köszönetet mondani Kemény Lajosnak Professzor Úrnak a PhD programban való részvétel lehetőségért, valamint amiért lehetővé tette számomra kísérleteim elvégzését a Szegedi Tudományegyetem, Bőrgyógyászati és Allergológiai Klinika laborjában.

Szeretném őszinte hálámat kifejezni mentoromnak, Prof. Dr. Bata-Csörgő Zsuzsannának (Szegedi Tudományegyetem Bőrgyógyászati és Allergológiai Klinika, MTA-SZTE Dermatológiai Kutatócsoport) a témavezetéséért, a PhD tanulmányaimat kísérő kitartó támogatásáért, tanácsaiért, és a folyamatos inspirációért.

Köszönettel tartozom Dr. Bebes Attilának és Dr. Groma Gergelynek kiváló javaslataikért, új ötleteikért és felbecsülhetetlen értékű tanácsaikért.

Szeretnék köszönetet mondani Dr. Manczinger Máténak és Viharosné Dósa Évának, amiért segítettek statisztikai elemzésekkel alátámasztani eredményeimet.

Nagy hálával tartozom Kohajda Mónikának folyamatos és fáradhatatlan segítségéért, valamint köszönettel tartozom Függs Róbertnének és Dr. Kui Róbertnek a pikkelysömörös betegek gyűjtéséért és a biológiai minták előkészítéséért.

Hálás vagyok kollégáimnak, Dr. Vas Krisztinának, Hambalkó Szabolcsnak, Balog Zsanettnek és Palotás Zsuzsannának, a kutatási technikák elsajátításában végzett segítségükért és gondoskodó támogatásukért.

Nagy hálával tartozom Prof. Dr. Wim Declercq-nek, amiért lehetőséget kaptam, hogy laboratóriumi gyakornokként dolgozhassam a VIB-UGent Biokémiai és Molekuláris biológiai Intézet laborjában a ghenti egyetemen.

Hálás köszönettel tartozom minden egyes kollégámnak segítségükért, hiszen valamilyen formában mindannyian hozzájárultak ahhoz, hogy ez a munka létrejöjjön.

Jelen munka az OTKA K83277, K105985, K111885, NK105369, valamint az Európai Unió és a Magyar Állam társfinanszírozásával, az Európai Szociális Alap keretében TÁMOP-4.2.4.A / 2-11-1 / 2012-0001 pályázatok finanszírozásával valósult meg.

Végül, de nem utolsósorban szeretném kifejezni hálámat minden családtagomnak, akik végtelen szeretetükkel, támogatásukkal és bátorításukkal szüntelen támaszként álltak mellettem.